Notice utilisateur

Trousses HISTO SPOT® SSO

Trousses de test pour le typage des allèles HLA par méthode de génétique moléculaire

CE 0123 IVD

Lire attentivement les instructions figurant dans le manuel d'utilisation du ou des système(s) et sur les étiquetages, et/ou dans la notice d'utilisation du réactif.

REF **726010 : HISTO SPOT® A 4D**	(96 tests)	**Version : 11/2013**
REF **726020 : HISTO SPOT® B 4D**	(96 tests)	**Edition : 2013-11**
REF **726030 : HISTO SPOT® C 4D**	(96 tests)	
REF **726040 : HISTO SPOT® DRB1 4D**	(96 tests)	
REF **726045 : HISTO SPOT® DRB3/4/5**	(96 tests)	
REF **726050 : HISTO SPOT® DQB1 4D**	(96 tests)	
REF **726051 : HISTO SPOT® DQB1 4D/ DQA1**	(96 tests)	
REF **726060 : HISTO SPOT® DPB1**	(96 tests)	
REF **726061 : HISTO SPOT® DPB1**	(24 tests)	
REF **726098 : HISTO SPOT® *Reagent Kit***		

Table des matières

1. DESCRIPTION DU PRODUIT 2
2. PRINCIPE DU TEST 2
3. MATÉRIEL 3
3.1 Réactifs fournis avec les trousses HISTO SPOT® spécifiques de locus 3
3.2 Réactifs fournis avec la trousse HISTO SPOT® *Reagent Kit* 4
4. CONSERVATION ET STABILITÉ 4
5. PROTOCÔLE 5
5.1 Précautions et recommandations 5
5.2 Isolement de l'ADN 5
5.3 Amplification de l'ADN 6
5.4 Hybridation & Détection automatisées par le processeur MR.SPOT® 7
5.4.1 Préparation des réactifs nécessaires 7
5.4.2 Démarrage de l'instrument MR.SPOT® 8
5.4.3 Transfert des images sur un PC pour l'interprétation 9
5.4.4 Interprétation des images à l'aide du logiciel HISTO MATCH 9
6. PRECAUTIONS ET TRAITEMENT DES DECHETS 10
7. CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES 11
7.1 Évaluation des performances 11
7.2 Amplifications par réaction PCR 11
8. LIMITES DE LA MÉTHODE 11
9. CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE 12
10. GESTION DES INCIDENTS 13
11. MARQUES COMMERCIALES UTILISÉES 13

Distribué en Belgique, en France et au Luxembourg par :
médiane diagnostics Z.A. de la Chaîne 78370 PLAISIR **+33 1.30.07.50.60** info@mediane-diag.fr

BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany
Tel.: +49 (0) 6404 / 925-0
Fax: +49 (0) 6404 / 925-250
www.bag-healthcare.com
info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:
Tel.: +49 (0) 6404 / 925-450
Fax: +49 (0) 6404 / 925-460
verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:
Tel.: +49 (0) 6404 / 925-125
Fax: +49 (0) 6404 / 925-421
service@bag-healthcare.com

1. DESCRIPTION DU PRODUIT

Le système HISTO SPOT® SSO est un test de diagnostic *in vitro* pour le typage tissulaire des allèles HLA, par méthode de génétique moléculaire. Les résultats de typage ont une résolution basse à moyenne. Le système est composé des trousses de typage HISTO SPOT®, de la trousse de réactifs communs HISTO SPOT® *Reagent Kit*, du processeur MR.SPOT® et du logiciel d'interprétation HISTO MATCH.

Les trousses de typage HISTO SPOT® contiennent tous les composants nécessaires à la réaction PCR ainsi que les cupules réactionnelles avec des sondes d'oligonucléotides spécifiques de séquence pour la détection des produits PCR. La trousse HISTO SPOT® *Reagent Kit* contient tous les réactifs nécessaires à l'hybridation et à la détection. Elle peut être utilisée en association avec toutes les trousses de typage HISTO SPOT®.

L'instrument MR.SPOT® est spécialement conçu pour être utilisé avec les trousses HISTO SPOT®, et traite entre 1 et 96 échantillons par cycle. Il automatise l'analyse depuis l'hybridation jusqu'à la détection et la prise d'images qui serviront à l'interprétation des résultats.

Le logiciel HISTO MATCH est nécessaire à la lecture des images et l'interprétation des résultats.

2. PRINCIPE DU TEST

Le test est divisé en quatre étapes de base :

- Isolement de l'ADN
- Amplification par PCR
- Hybridation et Détection
- Interprétation des données

L'isolement de l'ADN est réalisé sur l'échantillon clinique, par une méthode d'isolement d'ADN définie au laboratoire ou avec une trousse commerciale.

L'ADN est ensuite amplifié par une série de réactions PCR chacune spécifique d'un locus HLA ; barrettes PCR prêt à l'emploi, tampon PCR et solution de $MgCl_2$ sont fournis dans la trousse. La spécificité de l'amplification est obtenue par un ensemble d'amorces biotinylées, conçues pour amplifier spécifiquement le locus HLA ciblé.

Après le processus d'amplification PCR, les barrettes PCR contenant les amplicons marqués à la biotine sont transférées sur l'instrument. Le processeur MR.SPOT® ajoute le tampon d'hybridation à chaque puits et transfère chaque mélange (amplicon & tampon d'hybridation) dans sa cupule réactionnelle contenant des sondes SSO immobilisées à l'aide de la biopuce collée au fond (SSO : oligonucléotides spécifiques d'une séquence). Ces sondes sont soit de simples sondes d'oligonucléotides, soit une association d'au moins 2 sondes individuelles, immobilisées dans la même zone (sonde mosaïque) et conçues pour améliorer l'identification des polymorphismes situés en position -cis. Les amplicons marqués à la biotine se fixent aux sondes SSO qui contiennent une séquence cible complémentaire et ils peuvent ensuite être détectés par une simple réaction colorimétrique. Pour éviter la fixation non spécifique d'amplicons dans les cupules réactionnelles, la toute première tâche du processeur

MR.SPOT® est de traiter chaque puits au préalable avec le tampon de blocage. Après une étape de lavage drastique pour éliminer tout amplicon non fixé, le conjugué, de la streptavidine marquée à la phosphatase alcaline, est ajouté aux cupules et se fixe sur la biotine des amplicons ayant hybridés avec la sonde SSO complémentaire. Suite à des étapes supplémentaires de lavage, le substrat de BCIP/NBT est ajouté et produit une coloration bleu-violet quand il est converti par la phosphatase alcaline. Les points colorés résultants au fond de chaque cupule réactionnelle sont photographiés par une caméra intégrée au processeur MR.SPOT® et chaque image prise au fond de chaque cupule réactionnelle est transmise au logiciel HISTO MATCH installé sur le ou les PC de validation du laboratoire.

Le programme d'analyse d'image du logiciel HISTO MATCH détermine l'intensité de chaque point (*spot*) présente sur la biopuce et la compare à l'intensité de son fond. À partir de ces données, les réactions positives et négatives sont déterminées en comparant à un seuil commun. L'application HISTO MATCH calcule à partir de ces valeurs, le reflet du schéma d'hybridation observé, leur correspondance allélique.

3. MATÉRIEL

3.1 Réactifs fournis avec les trousses HISTO SPOT® spécifiques de locus

Testwells I **X** — **Cupule réactionnelle**, emballée individuellement par barrette, chaque barrette renferme 8 tests (cupules) et chaque cupule contient des sondes d'oligonucléotides spécifiques de séquence.

Mastermix I **X** — **Mélange initial**, prêt à l'emploi, contenant des amorces biotinylées du locus ciblé, des dNTP, de la Taq polymérase, du tampon et 0,05 %

MgCl2 — **Chlorure de magnésium**, 6 mM, prêt à l'emploi, contient 0,001 % de ProClin® 300

N.B.: **X = A**, **B**, **C**, **DRB1, DRB3**/**4**/**5**, **DQB1**, **DQ** ou **DPB1**

Chaque trousse est livrée avec un **CD** d'information comportant le fichier relatif aux sondes présentes sur les biopuces qui doit être enregistré dans la base de données du logiciel d'interprétation HISTO MATCH s'il s'agit d'un nouveau lot pour le laboratoire
N.B.: pour obtenir des détails, consulter le mode d'emploi du logiciel HISTO MATCH

A ce sujet il convient de différencier les notions Trousse & n° de Lot de la trousse, Vrac de sondes, puis Lot du vrac utilisé dans une trousse.

- **Trousse :** p. ex. **HISTO SPOT® A**, définit le locus analysé (**Lot** de la trousse).
- **Vrac :** p. ex. **A084**, **A085**, définit la spécificité des sondes dudit vrac et leurs positions sur les biopuces contenues dans les cupules réactionnelles. Un même vrac (**Lot** de sondes) peut être utilisé pour plusieurs productions de trousses.
- **Lot de vrac :** p.ex. A0**85-1**, A0**85-2**, A0**85-3**, définit comment une sonde donnée réagit par rapport aux sondes de contrôle (valeurs seuil) et correspondant à sa calibration. Chaque **Lot** de vrac sert à la fabrication de cupules réactionnelles et définit leur dates de fabrication et de péremption.

3.2 Réactifs fournis avec la trousse HISTO SPOT® Reagent Kit

Les réactifs communs d'une trousse sont en quantité suffisante pour réaliser 96 typages. Chaque trousse de réactifs communs contient :

BLOCKBUF **Tampon de blocage**, prêt à l'emploi, incolore, contient 0,001 % de ProClin® 150

HYBBUF **Tampon d'hybridation**, prêt à l'emploi, contient 0,001 % de colorant, 0,1 % de dodécylsulfate de sodium et 0,001 % de ProClin® 150

STRGWASH **Tampon de lavage drastique**, prêt à l'emploi, contient 0,001 % de colorant, 0,1 % de dodécylsulfate de sodium et 0,001 % de ProClin® 150

TBSWASH **Tampon de lavage TBS** (**T**ris **B**uffered **S**aline), prêt à l'emploi, contient 20 mM de Tris, 0,003 % de colorants et 0,001 % de ProClin® 150

SUBS **Substrat BCIP/NBT**, prêt à l'emploi (bromo-5-chloro-4-indolyl-3-phosphate / bleu de chlorure de nitrotétrazolium)

CONJ **Conjugué** (concentré), Streptavidine marquée à la phosphatase alcaline, < 0,1 % d'azide de sodium - **à diluer au 1:1666[e]** dans du tampon de blocage

3.3 Réactifs et équipements nécessaires mais non fournis

- Processeur MR.SPOT® avec le logiciel HISTO MATCH, RÉF 726100
- Embouts de pipettes pour l'instrument MR.SPOT®, 1000 µL RÉF 726099 et 200 µL RÉF 726097
- Réactifs pour l'isolation des ADN - **N.B.:** éviter la technique du relargage au sel
- Plaques de PCR à jupe et bouchons ou films associés
  Recommandation : HISTO SPOT® PCR Frameplate RÉF 726220, HISTO SPOT® PCR Caps RÉF 726090 ou HISTO SPOT® PCR Foils, RÉF 726089
- Thermocycleur
- Eau désionisée
- Pipettes à volume variable (gamme 0,5 – 1 000 µL) et embouts jetables

4. CONSERVATION ET STABILITÉ

Tous les réactifs et composants des trousses doivent être conservés à une température entre 2 °C et 8 °C. La date de péremption est indiquée sur l'étiquette de chaque composant. Elle est valable pour les contenants non entamés. La date de péremption indiquée sur l'étiquette externe de la trousse l'est en fonction du composant contenu dans la trousse ayant la validité la plus courte.

Les réactifs ouverts seront à utiliser dans les 3 mois. La dilution du conjugué doit être préparée extemporanément à chaque série de test.

5. PROTOCÔLE

5.1 Précautions et recommandations

Les techniques de génétique moléculaire sont des méthodes particulièrement sensibles qui doivent être réalisées par du personnel bien formé, ayant l'expérience des techniques de génétique moléculaire et des tests d'histocompatibilité. Les résultats de ces tests ne doivent pas être utilisés comme seul déterminant pour prendre des décisions cliniques.

Les directives de transplantation ainsi que les normes EFI doivent être respectées, de manière à réduire le risque de typages erronés. Ceci est particulièrement important dans le cas de résultats discordants observés entre les méthodes de sérologie et de génétique moléculaire.

Des précautions doivent être prises pour éviter la contamination et donc les fausses réactions :

- Porter des gants pour manipuler (sans poudre si possible).
- Utiliser de nouveaux embouts à chaque étape de pipetage (avec un filtre intégré).
- Utiliser des zones de travail séparées pour les tâches avant l'amplification (isolement de l'ADN et préparation des réactions) et pour les tâches après l'amplification (hybridation et détection). De préférence, utiliser deux pièces différentes (zones pré-PCR et post-PCR).
- Les amplicons ne doivent pas être ramenés dans la zone de travail servant à la préparation des PCR.
- Utiliser les dispositifs et autres matériels uniquement à leur place respective et assurer à ce que ne puisse pas les échanger.

5.2 Isolement de l'ADN

Préparer l'ADN échantillon par la méthode standard utilisée par le laboratoire pour l'isolement des ADN destinés à la PCR (il est préférable de ne pas utiliser la technique du relargage au sel).

Méthodes d'isolation d'ADN validées :

- Colonnes de marque Quiagen

Méthodes utilisées avec succès en pratique :

- Quick-Gene 610L, 800, 810 & Mini-80 (extracteurs de marque Kurabo)
- EZ-1 / GenoM6 (extracteurs de marque Quiagen)
- Maxwell 16 (Promega)
- QuatroProbe (BeeRobotics)

La présence d'héparine peut inhiber la PCR. De ce fait, il est recommandé d'utiliser du sang recueilli sur EDTA ou sur citrate pour le typage.

L'ADN de l'échantillon doit avoir une concentration comprise entre 15 et 30 ng/µL et un indice de pureté (rapport DO_{260}/DO_{280}) compris entre 1,5 et 2,0. Des valeurs plus élevées sont le signe de la présence d'ARN, des valeurs plus faibles, celui d'une contamination par des protéines.

5.3 Amplification de l'ADN

Utiliser des plaques PCR à jupe pour l'amplification, car elles doivent ensuite être maintenues au niveau de la jupe par un collier sur le bloc d'hybridation du processeur MR.SPOT®. Les plaques HISTO SPOT® PCR *Frameplates* ont été validées pour cette application, les plaques provenant d'autres fournisseurs doivent être validées par l'utilisateur.

Pour chaque échantillon à amplifier, ajouter les réactifs suivants à chaque tube PCR :

10 µL Mélange initial
5 µL $MgCl_2$
5 µL Échantillon d'ADN (15-30 ng/µL)

Le volume total de chaque réaction d'amplification est de **20 µL**.

Pré-mélange pour plusieurs échantillons :

nb d'échantillons **+ 2** x **10 µL** } mélange initial
nb d'échantillons **+ 2** x **5 µL** $MgCl_2$ } **par échantillon**

utiliser ensuite **15 µL** de ce pré-mélange pour chaque PCR.

N.B.: il est important que la concentration en ADN soit comprise pour tous les échantillons entre **15** et **30** ng/µL. Des concentrations plus élevées peuvent conduire à des réactions de sondes faussement positives et des concentrations plus faibles peuvent entraîner des échecs d'amplification.

Pour réaliser un **Contrôle négatif**, préparer une réaction PCR avec de l'eau désionisée à la place de l'ADN échantillon.

Sceller les barrettes PCR avec les bouchons, les centrifuger rapidement, les placer dans le thermocycleur et lancer l'amplification dans les conditions suivantes :

Étape de programme	Durée	Température	Nb de cycles
Première dénaturation	2 mn	96 °C	1 cycle
Dénaturation	15 s	96 °C	10 cycles
Hybridation + extension	60 s	65 °C	
Dénaturation	10 s	96 °C	20 cycles
Hybridation	50 s	61 °C	
Extension	30 s	72 °C	
Maintien	∞	22 °C	

Ces conditions sont identiques pour tous les thermocycleurs. Toutefois, le temps total nécessaire pour cette étape varie selon la « vitesse de rampe » de chaque modèle de thermocycleur.

Les modèles suivants de thermocycleurs ont été validés pour être utilisés avec le test HISTO SPOT SSO :

Applied Biosystems : PE 9600, PE 9700 (vitesse de rampe du PE 9600 !!) & Veriti™

Biorad : PTC 100 / PTC 200 & MyCycler

Eppendorf : Mastercycler EP Gradient S

N.B.: en cas d'utilisation d'autres thermocycleurs, une validation doit être effectuée par l'utilisateur.

De manière générale, il est recommandé d'utiliser jamais une vitesse de rampe autre que 1 à 2 °C/seconde.

Une fois l'étape d'amplification terminée, les échantillons peuvent être analysés immédiatement ou conservés entre 2 °C et 8 °C pendant un maximum de 5 jours sous condition d'être parfaitement scellés.

Il n'est pas nécessaire de réaliser un gel pour contrôler l'amplification. Cela est d'autant plus justifié que l'amplification peut être correcte même si le gel ne présentait qu'une bande très faiblement visible. - Si cependant il est prévu de réaliser un gel, ne veuillez pas utiliser plus que 2 à 3 µL d'amplicon. Les tailles des différents amplicons sont indiquées sur le CD d'information fourni avec chaque trousse (fichier .xls, tableau de correspondance, deuxième onglet intitulé « Notes »).

5.4 Hybridation & Détection automatisées par le processeur MR.SPOT®

5.4.1 Préparation des réactifs nécessaires

Sortir la trousse HISTO SPOT® *Reagent Kit* et les cupules réactionnelles HISTO SPOT® des loci à typer du réfrigérateur et les laisser se réchauffer à température ambiante.

On peut observer des cristaux de sel dans le Tampon d'hybridation et dans la Solution de lavage drastique. Dans ce cas, réchauffer les réactifs à 30 °C pour dissoudre les cristaux.

N.B.: réchauffer tout le contenu du flacon et pas seulement un aliquote !

Le conjugué doit être dilué au 1:1666^{e} dans du tampon de blocage. La dilution du conjugué doit être préparée extemporanément à chaque série de test.

N.B. : le conjugué doit être mélangé au vortex et centrifugé à chaque fois avant l'étape de dilution !

Les volumes nécessaires de réactifs communs varient selon le nombre de barrettes à utiliser. Le processeur MR.SPOT® affiche les volumes nécessaires pour le nombre de barrettes choisi sur son écran tactile (suivez l'aide en ligne).
Verser les volumes nécessaires de réactifs dans les réservoirs marqués en conséquence (nom et code couleur) tout en suivant l'aide en ligne.

Ouvrir soigneusement la plaque ou la/les barrette(s) PCR (en provenance du thermocycleur) et la/ les placer sur le bloc échantillon. S'assurer du bon positionnement et de la bonne orientation de la plaque ou de la/les barrette(s) (suivez l'aide en ligne).

S'assurer également de l'absence de saleté ou de particules de plastique sur le bloc échantillon, car celles-ci peuvent perturber le transfert de chaleur pendant l'hybridation.

Ouvrir soigneusement les emballages en aluminium des cupules réactionnelles.

Chaque barrette des 8 cupules réactionnelles peut être scindée en puits unitaire ou multiple conformément à la figure 1, si le nombre de tests à réaliser est inférieur à 8 :

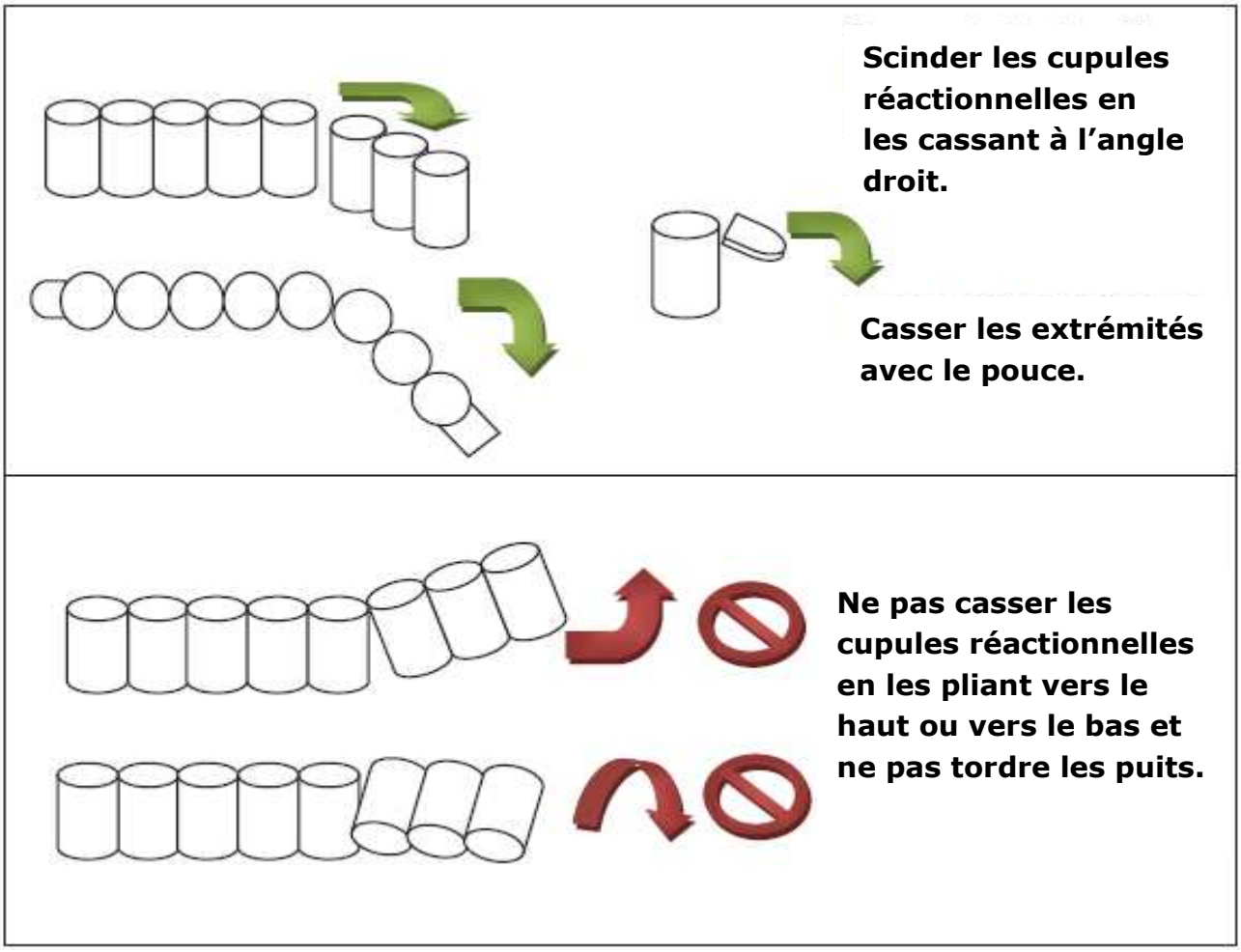

Scinder les cupules réactionnelles en les cassant à l'angle droit.
Casser les extrémités avec le pouce.
Ne pas casser les cupules réactionnelles en les pliant vers le haut ou vers le bas et ne pas tordre les puits.

Figure 1 Séparation de cupules réactionnelles unitaires

Attention : lors de l'utilisation de barrettes scindées il est important de s'assurer du bon positionnement sur le bloc réactionnel et de veiller à ce que les différents fragments ou puits unitaire ne se gênent pas au risque d'impacter leurs positionnements corrects.

5.4.2 Démarrage de l'instrument MR.SPOT®

Mettre sous tension le processeur MR.SPOT®, l'écran de démarrage s'affiche. Suivez les instructions à l'écran pour préparer le lancement de votre série.

N.B.: pour obtenir des détails, consulter le mode d'emploi du processeur MR.SPOT®.

Remarque : éviter d'exposer le processeur MR.SPOT® et les réactifs associés au soleil !

5.4.3 Transfert des images sur un PC pour l'interprétation

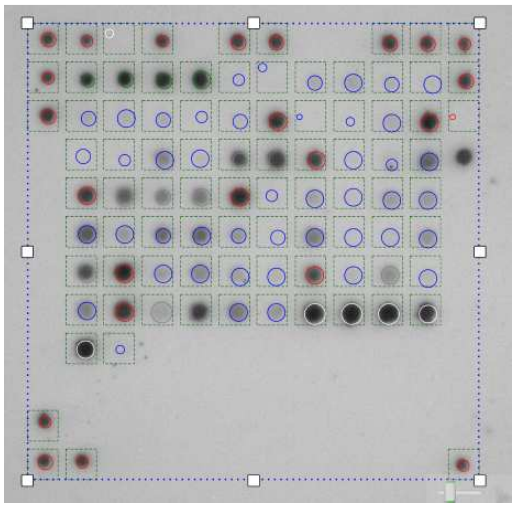
Transférer les données au logiciel HISTO MATCH par l'intermédiaire du réseau (ou à défaut d'une clé USB), selon la description dans le manuel du logiciel HISTO MATCH.

5.4.4 Interprétation des images à l'aide du logiciel HISTO MATCH

Ouvrir le logiciel HISTO MATCH sur un des postes du réseau du laboratoire et interpréter les images selon la description dans le manuel du logiciel HISTO MATCH.

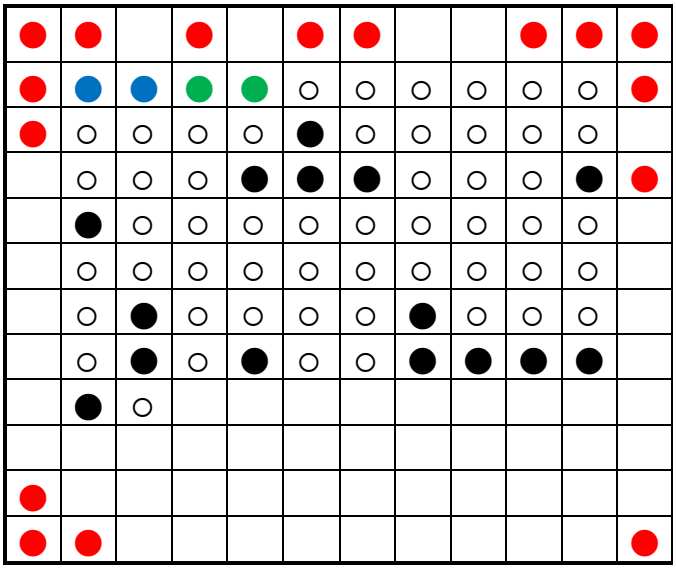
Les images doivent ressembler à l'exemple présenté à la Figure 2 ci-dessous.

La Figure 3 présentée à la suite donne une illustration schématique de l'image type obtenue et des fonctions des différentes sondes.



N.B.: la couleur des cercles autour des points obtenus, qui sont plus ou moins grands et plus ou moins denses, indique la fonction de chaque point
(l'illustration schématique donnée par la figure 3 ci-dessous donne de plus amples détails)

Figure 2 Image d'un résultat pour le HLA A



● = *sondes de position*, qui réagissent avec les amorces d'amplification. Elles indiquent que les amorces ont bien été présentes et que lors du travail automatique les réactifs communs ont été distribués par l'instrument

Par ailleurs, elles permettent au logiciel de positionner l'image avant l'interprétation

Tout schéma correspond à un lot de vrac

● + ● = *contrôles d'amplification* pour les exons 2 & 3, traités en double. Ces sondes sont universelles pour les allèles du locus ciblé et montre ainsi la réussite de la PCR

Leur fonction principale est de fixer le seuil pour les sondes spécifiques d'allèle

● = *sonde spécifique* d'allèle, signal positif

O = *sonde spécifique* d'allèle, signal négatif

Figure 3 Illustration schématique du résultat et de la fonction des sondes

6. PRECAUTIONS ET TRAITEMENT DES DECHETS

Le système HISTO SPOT® est conçu pour une utilisation de diagnostic *in vitro* et doit être manipulé par du personnel qualifié et formé. Toute utilisation doit respecter les bonnes pratiques de laboratoire.

Les produits biologiques utilisés pour l'extraction de l'ADN, par exemple le sang ou un tissu humain, doivent être manipulés comme des substances potentiellement infectieuses. Il est donc recommandé de respecter les précautions de sécurité adaptées pour manipuler les produits biologiques (ne pas pipeter à la bouche, utiliser des gants jetables pour manipuler les produits biologiques et réaliser le test, se désinfecter les mains une fois la manipulation terminée).

Les déchets biologiques doivent être inactivés avant leur élimination (ex.: dans un autoclave). Les produits jetables doivent être autoclavés ou incinérés après usage.
Un renversement de produits potentiellement infectieux doit être ramassé immédiatement avec du papier absorbant et les zones contaminées doivent être nettoyées avec un désinfectant standard adapté ou avec de l'alcool à 70 %.

Les matériels utilisés pour nettoyer les renversements, y compris les gants, doivent être inactivés avant leur élimination (ex.: dans un autoclave).

Le tampon de blocage, le tampon d'hybridation, le tampon de lavage drastique et le tampon de lavage TBS contiennent du ProClin® 150, et la solution de chlorure de magnésium contient du ProClin® 300. La concentration en conservateur dans les réactifs est de seulement 0,001 %. Éviter toutefois le contact avec la peau et les membranes muqueuses.

Le tampon PCR et le conjugué contiennent de l'azide de sodium comme conservateur. Les réactifs contiennent une concentration < 0,1 % d'azide de sodium, qui n'est pas considérée comme dangereuse. Éviter toutefois le contact avec la peau et les membranes muqueuses. L'azide de sodium peut réagir avec les tuyauteries de plomb et de cuivre et former des azides métalliques explosifs. Au moment d'éliminer les solutions contenant de l'azide de sodium dans les éviers de laboratoire, rincer les tuyauteries avec de grandes quantités d'eau pour éviter la formation d'azide.

Toute la manipulation avec les réactifs doit être réalisée en respectant les précautions adaptées. Porter une protection oculaire, une blouse de laboratoire et des gants jetables pour manipuler les réactifs. Éviter le contact de ces produits avec la peau, les yeux et les membranes muqueuses. En cas de contact, rincer immédiatement avec une grande quantité d'eau. Sinon, une brûlure pourrait se produire.

Si des réactifs sont renversés, les diluer avec de l'eau avant de les éponger. Ne pas exposer le substrat aux métaux ni aux agents oxydants.

L'élimination de tous les échantillons, des réactifs non utilisés et des déchets doit respecter les réglementations nationales, fédérales et locales.

Éviter la contamination microbienne des réactifs au moment de prélever un aliquot dans les flacons. L'utilisation de pipettes et de pointes de pipettes stériles jetables est recommandée. Ne pas utiliser de réactifs présentant une turbidité ou une contamination microbienne apparente.

Les **Fiches de Données de Sécurité** peuvent être téléchargées à l'adresse **www.bag-healthcare.com**

7. CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCE

7.1 Évaluation des performances

Toutes les trousses HISTO SPOT® SSO ont été évaluées lors d'une étude portant sur des échantillons auparavant typés avec d'autres méthodes (*ex : SSP, Séquençage*).

Aucune discordance n'a été observée entre les méthodes de typage.

Pour chaque lot, la spécificité de chaque sonde a été vérifiée à l'aide d'ADN d'échantillons de référence.

7.2 Amplifications par réaction PCR

Les allèles amplifiés par chaque trousse HISTO SPOT® SSO, la version de la nomenclature HLA et les exons amplifiés sont indiqués avec les informations spécifiques du lot respectif. Ces informations sont rassemblées sur un CD fourni avec chaque trousse.

7.3 Résolution de la technique

Le système de typage HISTO SPOT® SSO est conçu pour fournir au minimum des résultats sans ambiguïté au niveau des groupes d'allèles, c'est-à-dire sur une résolution sur 2 digits.

Des associations d'allèles différentes, qui recoupent des groupes d'allèle, mais qui présentent le même schéma de sondes positives sont considérées comme ambiguës.

Les trousses de typage HISTO SPOT® **4D** donnent, en cas d'utilisation d'un filtre qui ne tient compte que des allèles fréquents (p.ex. filtre 4D), généralement des résultats sans ambiguïté au niveau de l'allèle (4 digits).

Le critère pour définir un allèle comme étant fréquent « 4D » est le suivant : la fréquence de cet allèle est de ≥ 0,5 % dans au moins une population composée de ≥ 1000 échantillons tel que documenté sur le site www.allelefrequencies.net.

8. LIMITES DE LA MÉTHODE

En raison de la grande sensibilité de l'analyse par PCR aux variations de concentration et de qualité de l'ADN, seuls des échantillons d'ADN avec une concentration comprise entre 15 et 30 ng/µL et un indice de pureté (rapport DO_{260}/DO_{280}) compris entre 1,5 et 2,0 doivent être utilisés.

Un soin particulier doit être pris pour éviter la contamination des réactifs de la trousse et des autres produits et équipements de laboratoire avec des amplicons ou de l'ADN. Il est fortement recommandé de réaliser régulièrement des tests de contamination (p.ex.: BAG Wipetest, réf. 7091) et d'utiliser des contrôles négatifs dans chaque série d'analyse.

L'hybridation est un procédé très sensible à la température. De ce fait, les trousses HISTO SPOT® SSO ne doivent être utilisées qu'en association avec le processeur MR.SPOT® pour assurer des températures et temps d'incubation valides.

Tous les instruments (p.ex.: pipettes, thermocycleurs, blocs chauffants, instrument MR.SPOT®) doivent être étalonnés conformément aux instructions des fabricants. L'exactitude et l'uniformité de température du thermocycleur peuvent être testées avec la trousse BAG CyclerCheck, réf. 7104.

9. CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE

Le Contrôle qualité des nouveaux lots de trousses HISTO SPOT® SSO peut être réalisé à l'aide d'un « panel maison » d'échantillons d'ADN, typés pour les critères HLA dont la trousse est spécifique.

Côté système chaque biopuce (cupule réactionnelle) renferme des **Contrôles positifs** internes pour pouvoir vérifier la réussite des réactions d'amplification et d'hybridation.

Il est recommandé d'utiliser des **Contrôles négatifs** pour détecter d'éventuelles contaminations. Préparez pour cela un mix initial sans ADN et l'utiliser le lors des réactions d'amplification et d'hybridation comme Contrôle négatif.

10. GESTION DES INCIDENTS

Symptôme	Problème(s) possible(s)	Solution(s) éventuelle(s)
- Dysfonctionnement de l'instrument	- Nombreux	- Consulter le manuel utilisateur du système MR.SPOT®
- Message d'erreur au transfert de données	- Erreur de transfert des données	- Transférer les données manuellement avec une clé USB
- Aucun résultat	- Erreur d'adressage	- Réaliser l'adressage manuellement
- Seuls les spots de contrôle sont positifs	- ADN non ajouté à la PCR ou erreur d'amplification	- Recommencer toute l'analyse et vérifier le produit PCR sur gel
- Sondes faussement positives	- Utilisation d'une quantité d'ADN trop importante ou conjugué trop concentré (non centrifugé)	- Vérifier la concentration en ADN, centrifuger le conjugué avant son utilisation
- Absence d'amplification de l'exon	- Concentration en ADN trop élevée ou ADN dégradé	- Vérifier la concentration en ADN, tester l'ADN sur gel
- Aucun résultat ou résultat non concluant en raison de signaux faibles	- Erreur de dilution du conjugué ou amplification faible - Dysfonctionnement de l'instrument	- Recommencer l'analyse - Vérifier la température d'hybridation sur l'instrument

11. MARQUES COMMERCIALES UTILISÉES

- ProClin® est une marque commerciale de l'entreprise Rohm & Haas.
- BCIP® est une marque commerciale de Sigma Aldrich Co.
- Veriti™ est une marque commerciale d'Applied Biosystems.

12. EXPLICATION DES SYMBOLES UTILISÉS

IVD	Pour usage de diagnostic *in vitro*
	Température de conservation
LOT	N°de lot
	Utiliser avant
REF	Code produit
	Consulter le Mode d'emploi
HLA TYPING	Destiné au : Typage HLA
Mastermix | A	Mélange initial pour l'amplification du locus HLA-A
Mastermix | B	Mélange initial pour l'amplification du locus HLA-B
Mastermix | C	Mélange initial pour l'amplification du locus HLA-C
Mastermix | DRB1	Mélange initial pour l'amplification du locus HLA-DRB1
Mastermix | DQB1	Mélange initial pour l'amplification du locus HLA-DQB1
Mastermix | DQ	Mélange initial pour l'amplification des loci HLA-DQB1 & DQA1
Mastermix | DPB1	Mélange initial pour l'amplification du locus HLA-DPB1
Mastermix | DRB3/4/5	Mélange initial pour l'amplification des loci HLA-DRB3/4/5
Testwells | A	Cupules réactionnelles avec sondes fixées pour typer le locus HLA-A
Testwells | B	Cupules réactionnelles avec sondes fixées pour typer le locus HLA-B
Testwells | C	Cupules réactionnelles avec sondes fixées pour typer le locus HLA-C
Testwells | DRB1	Cupules réactionnelles avec sondes fixées pour typer le locus HLA-DRB1
Testwells | DQB1	Cupules réactionnelles avec sondes fixées pour typer le locus HLA-DQB1
Testwells | DQ	Cupules réactionnelles avec sondes fixées pour typer les loci HLA-DQB1 & A1
Testwells | DPB1	Cupules réactionnelles avec sondes fixées pour typer le locus HLA-DPB1
Testwells | DRB3/4/5	Cupules réactionnelles avec sondes fixées pour typer les loci HLA-DRB3/4/5
MgCl2	Solution de Chlorure de magnésium
BLOCKBUF	Tampon de blocage
HYBBUF	Tampon d'hybridation
STRGWASH	Solution de lavage drastique
TBS	Tampon TBS (Tris buffered saline)
SUBS	Substrat
CONJ	Conjugué (Streptavidine marquée à la phosphatase alcaline)

N.B. : pour les ***modes d'emploi*** en d'**autres langues**, veuillez utiliser ce lien :
http://www.bag-healthcare.com/en/Diagnostika/Downloads/